

ÉTUDE DE LA CASÉINE ET DE SA TRANSFORMATION EN PARACASÉINE

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur ès sc. chimiques

par

Pierre BAUDET

de

Bottens (Vaud)

Thèse N° 1141



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ÉTUDE DE LA CASÉINE ET DE SA TRANSFORMATION EN PARACASÉINE

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur ès sc. chimiques

par

Pierre BAUDET

de

Bottens (Vaud)

Thèse N° 1141



GENÈVE

ÉDITIONS MÉDECINE ET HYGIÈNE

1958

La Faculté des Sciences, sur le préavis de Monsieur le Professeur E. Cherbuliez, autorise l'impression de la thèse présentée par Monsieur Pierre Baudet, intitulée: «Etude de la caséine et de sa transformation en paracaséine», sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 23 mai 1949.

Le doyen :

P.E. WENGER

Thèse N° 1141

Ces travaux ont été exécutés au courant des années 1947/49 dans les Laboratoires de chimie pharmaceutiques de l'Université de Genève.

Je remercie Monsieur le Professeur E. Cherbulliez pour la bienveillante attention qu'il a portée à ce travail.

A MES TRES CHERS PARENTS.

On sait depuis assez longtemps que la caséine du lait de vache est un mélange de plusieurs protéines²⁾. On doit notamment à Warner³⁾ un procédé de séparation de la caséine en deux constituants désignés par α et β ; antérieurement, Mellander⁴⁾ avait révélé par l'examen électrophorétique que la caséine devait contenir au moins trois protides.

En reprenant l'étude des constituants de la caséine, nous nous sommes inspirés du mode de séparation mis au point par Warner. Cet auteur précipite la caséine dissoute sous forme de sels sodiques, à son point isoélectrique à basse température (2°); la fraction α précipite, tandis que β reste en solution pour flocculer à son tour lorsqu'on élève la température à 40°; reprécipitée, la caséine β s'est révélée homogène à l'électrophorèse, tandis que α s'est montrée dédoublable dans certaines conditions de pH et de concentration.

Préparation de la caséine.

Nous avons préparé nos caséines à partir de lait frais écrémé par centrifugation⁵⁾, par précipitation isoélectrique entre 15 et 20°. Une précipitation à température plus basse conduirait à la perte d'une certaine quantité de la fraction β . Une triple reprécipitation du produit redissous comme sel sodique fournit une caséine extrêmement pauvre en cendres; la déshydratation par l'alcool et l'acétone livre un produit absolument blanc et pulvérulent.

La caséine ainsi préparée se dissout intégralement aux pH inférieurs ou supérieurs à son point isoélectrique (4,6 à peu près), mais ces solutions sont nettement troubles. Ce trouble est dû à un constituant qu'on peut éliminer par filtration d'une solution à 1—2% de caséinate de sodium sur de la silice. Cette dernière retient le constituant responsable de la turbidité, à côté d'un peu de caséine α . Un traitement de l'adsorbant par de la soude très diluée suivi d'une acidulation du filtrat au pH 4,6 fournit un précipité qui cède à l'acétone tiède un phospholipide qui est responsable du trouble des solutions

¹⁾ IVème communication: Cherbuliez & Jeannerat, Helv. **22**, 959 (1939).

²⁾ Bibliographie voir par ex. Helv. **15**, 597 (1932).

³⁾ R. C. Warner, Am. Soc. **66**, 1725 (1944).

⁴⁾ Bioch. Z. **300**, 240 (1939).

⁵⁾ Nous remercions vivement les *Laiteries Réunies* à Genève qui ont bien voulu mettre à notre disposition un lait frais centrifugé à son arrivée.

de la caséine primitive. Le résidu insoluble dans l'acétone est constitué par de la caséine α .

La caséine débarrassée de ce lipide (que nous n'avons pas examiné de plus près) ne se distingue pas du produit primitif dans son comportement vis-à-vis de la présure. Voilà pourquoi nous ne considérons pas ce phospholipide comme un constituant proprement dit de la caséine.

Voici les caractéristiques de notre caséine:

humidité	13%	tyrosine	6,5 %
P (par hydrolyse alcaline ménagée)	0,86%	tryptophane	1,68%

Fractionnement de la caséine.

Par un fractionnement¹⁾ inspiré à la fois des indications de Warner²⁾ et de Cherbuliez & Meyer³⁾, nous avons pu retirer de la caséine purifiée les 4 fractions suivantes:

α environ 60% (décomposable en α_I et α_{II})
β environ 25%
γ environ 10%
δ environ 5% (= protéose de Hammarsten ⁴⁾)

Les caséines α et β . Voici un tableau des principales propriétés de ces deux constituants:

	α	β
Point isoélectrique	4,5	4,9
Solub. du sel sodique (pH 5 à 7,5)	sol.: solut. claire	sol.: solut. claire ou trouble selon âge
Solub. du sel calcique (pH 5 à 7,5)	soluble	insoluble
Solub. dans tampon lactique de pH = 3, de $\mu = 0,1$	0,5%	insoluble
Tyrosine	8,4%	2,6%
Tryptophane	1,7%	0,85%
Phosphore total	1,1%	0,60%
Phosphore minéralisé par hydro- lyse alcaline ménagée	1,1%	0,60%
Mobilité électrophorétique	$7,8 \cdot 10^{-5}$ $\text{cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ (pH 7,8; $\mu = 0,1; 3,08 \text{ volt/cm}$)	$2,9 \cdot 10^{-5}$ $\text{cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ (pH 7,6; $\mu = 0,1; 2,91 \text{ volt/cm}$)
Poids moléculaire minimum ⁵⁾	130000	48000

L'insolubilité du β -caséinate de calcium et sa solubilité en présence d' α -caséinate de calcium mettent en évidence le rôle de colloïde protecteur exercé par α vis-à-vis de β . Cette constatation confirme les idées émises en 1928 déjà par Linderstrom-Lang⁶⁾ au sujet de l'intervention probable d'un phénomène de ce genre dans le cas de la caséine.

¹⁾ V. partie expérimentale.

²⁾ Loc. cit.

³⁾ Helv. **16**, 600 (1933).

⁴⁾ Cherbuliez & Jeannerat, Helv. **22**, 959 (1939).

⁵⁾ Déterminé d'après les teneurs en tyrosine, tryptophane et phosphore.

⁶⁾ Z. physiol. Ch. **76**, 176 (1928); C. r. Lab. Carlsberg **17**.

L'existence de relations particulières entre caséines α et β est révélée également par leur comportement particulier au cours de leur séparation, comme on va le voir plus loin.

Caséine α . La séparation de cette fraction est basée sur le fait qu'au pH 4,6 et à 2°, cette fraction précipite, tandis que β , etc. restent en solution. Par répétition de cette opération, on obtient un produit qui ne contient plus qu'un peu de γ et la δ , dont on le débarrasse par reprécipitation au point isoionique en présence de sulfate d'ammonium à 5%; $\gamma + \delta$ restent alors en solution.

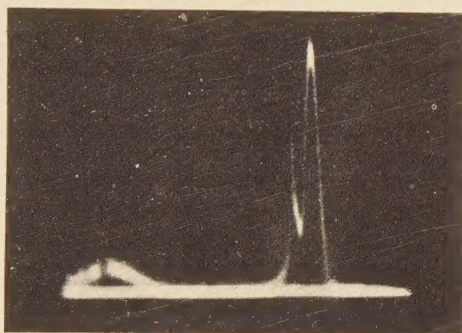


Fig. 1.

Diagramme électrophorétique de caséine α , conc. 0,75%, tampon de *Michaelis*, pH 7,8, $\mu = 0,1$, 3,08 volt/cm, 4° C, durée 180 min. Gradient ascendant, montrant le dédoublement en α_I et α_{II} .

Cette caséine se montre homogène à l'électrophorèse (tampon de *Michaelis* au véronal, de pH 7,8 à $\mu = 0,1$) à des concentrations supérieures à 1%; mais à des concentrations plus faibles (p. ex. 0,75%), on voit apparaître dans les mêmes conditions 2 gradients (voir Fig. 1). On peut du reste séparer α en deux fractions α_I et α_{II} par précipitation en présence de sulfate d'ammonium de $\mu = 2,2$ (5%) au pH 6, par chauffe à 40°.

Propriétés des caséines α_I et α_{II}

	α_I	α_{II}
Solub. du sel calcique (pH 7)	sol.; solut. laiteuse	sol.; solut. laiteuse
Solub. ds. sol. sal. de $\mu = 2,2$ à pH 6 et à 40°	soluble	insoluble
Tyrosine	8,2%	8,6%
Tryptophane	1,6%	1,7%
Phosphore minéralisé par hydrolyse alcaline ménagée	1,1%	1,0%

Caséine β . Si l'obtention d' α exempte de β est relativement aisée, il n'en est pas de même pour β qui retient toujours de l' α à côté d'un

peu de γ (comme le montre l'examen électrophorétique). Comme Warner l'avait déjà remarqué, seule une reprecipitation à très faible concentration (0,05 %) au pH 4,6, d'abord à 2°, où seul α précipite, puis à 20°, où β pur est obtenu (tandis que γ reste en solution) conduit au but.

Une interaction entre α et β apparaît encore dans le fait qu'une hydrolyse alcaline ménagée d'un mélange de β avec 20 % de α ne minéralise pas la totalité du phosphore, comme c'est le cas pour chaque fraction séparée. C'est ainsi que dans un mélange contenant 20 % de α d'après les teneurs en tyrosine et en tryptophane, le phosphore minéralisé facilement n'atteignait que 64 % du phosphore total. Il se forme probablement une combinaison entre α et β , peut-être avec intervention des groupes phosphorylés; l'existence d'une combinaison de ce genre pourrait expliquer aussi la constatation paradoxale, faite déjà par Warner, que la mobilité électrophorétique de β « brute » (c'est-à-dire contenant α), est inférieure à celle de β pur, malgré cette présence de α , plus mobile pourtant que β .

Examinée au microscope, la caséine β apparaît comme formée de petites particules arrondies, toutes de même forme et de même diamètre; elle est donc dans un état de précristallisation.

Caséine γ . Nous appelons ainsi une fraction séparée des filtrats de la précipitation soit de α soit de β , par addition de 2 vol. d'acétone à pH 6—6,3. Cette fraction — qui n'a pas encore été examinée de plus près — se différencie de α et de β notamment par son point isoélectrique de 5,2 (pH où elle ne précipite cependant qu'à des températures supérieures à 40° et en solution pas trop diluée), par ses teneurs en tyrosine (3,4 %) et en tryptophane (1,3 %), ainsi que par sa mobilité électrophorétique, un peu inférieure à celle de β . Son sel calcique ressemble à celui de la caséine β par son insolubilité à 40° entre les pH de 6 et de 7,5. Elle est aussi précipitée par l'acide trichloracétique 10 % à.

Caséine δ . Cette fraction avait déjà été trouvée par nous¹⁾, et son identité probable avec la protéose de Hammarsten constatée²⁾.

Partie expérimentale.

Caséine.

Caséine brute: du lait frais, écrémé par centrifugation, est additionné à 15—25° de ClH 0,1-n. goutte à goutte sous agitation mécanique modérée jusqu'à floculation (pH 4,6); papier Lyphan). L'approche de la floculation se signale par l'aspect porcelainique que prend le lait et par l'augmentation de la tension superficielle. La caséine précipitée est séparée par centrifugation de 20 minutes à 3000 t/min. à une température qui ne doit pas être inférieure à 15°.

Elimination des sels: la caséine brute est suspendue dans 100 parties d'eau et dissoute sous agitation mécanique par addition progressive de NaOH 0,1-n., de manière que le pH ne dépasse jamais 7. La solution, diluée par addition d'eau à 200 parties, est reprecipitée comme plus haut par ClH 0,1-n. Trois opérations de ce genre suffisent.

¹⁾ Cherbuliez & Meyer, Helv. 16, 600 (1933); Cherbuliez & Jeannerat, Helv. 22, 959 (1939).

²⁾ Cherbuliez & Jeannerat, Helv. 22, 959 (1939).

Traitement par des solvants organiques: le produit centrifugé de l'opération précédente est traité par de l'acétone sous agitation mécanique pendant 3 heures; après centrifugation, le culot est traité de la même manière par de l'alcool à 95%.

Délipidation: on prépare une solution de caséine à 1—2% dans de la soude très diluée comme plus haut et filtre la liqueur trouble sur un *Büchner* garni d'une couche de Supercell Standard sur du papier filtre. Le filtrat doit être à peine opalescent. La silice est suspendue dans de l'eau, la suspension, agitée, est amenée au pH 7 par NaOH 0,1-n. comme plus haut. Après centrifugation à 3000 t/min. pendant 20 min., on sépare la liqueur très opalescente et précipite la caséine α qu'elle contient, par acidulation par ClH 0,1-n. au pH 4,6. Le culot est traité directement à 30° par 1 vol. d'acétone pour 1 partie de caséine primitive pendant 1 heure. Après centrifugation et lavage à l'acétone, la caséine α récupérée est ajoutée à la caséine purifiée, retirée du filtrat aqueux par précipitation au point isolélectrique, et traitée à l'acétone et à l'alcool comme plus haut.

Les phospholipides précipitent de leur solution acétonique tiède par abaissement de la température à 0°.

Dessiccation: la caséine purifiée est portée encore humide dans un dessiccateur à chlorure de calcium ou à silicagel, qu'on évacue. Le produit est pulvérisé de temps en temps; on obtient ainsi une matière très pulvérulente. — Les lipides retirés de la fraction adsorbée sur le Supercell par traitement acétonique n'ont pas été examinés de plus près; ils contiennent du phosphore.

Fractionnement (voir schéma).

Caséine α : une solution de caséinate de sodium à 0,4% est portée brusquement au pH 4 par addition, d'un coup et sous forte agitation, de ClH 0,1-n. La solution claire est refroidie à 2° et maintenue à cette température pendant l'addition, goutte à goutte avec agitation, de NaOH 0,1-n. jusqu'au pH 4,6 (papier Lyphan). Après un accroissement progressif de l'opalescence, il y a précipitation de α brut; on laisse déposer le précipité pour vérifier si une prise décantée est limpide; sinon, on ajoute prudemment encore un peu de soude caustique. Par centrifugation à la chambre froide (4°), on obtient une caséine α qui contient un peu de β à côté de γ et de δ (protéose) et avec laquelle on répète la manipulation décrite, ce qui élimine pratiquement β . Cette opération est répétée encore 3 fois.

Cette caséine α est débarrassée des restes de γ et de protéose par dissolution, au pH 6, comme caséinate de sodium (concentration 0,5%). La solution est additionnée de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à raison de 5%, puis portée au point isoionique par addition, sous agitation, de ClH 0,1-n., à la température ordinaire: α précipite pur; γ et restent dans les eaux-mères.

Fractionnement de la caséine α : α_I et α_{II} . Une solution de caséinate α de sodium de 0,3% au pH 6 est additionnée de sulfate d'ammonium (force ionique 2,2) et chauffée à 40°. La solution se trouble progressivement; après 1 heure à cette température, on centrifuge le floculat (α_{II} brut). La liqueur claire est portée à pH 4,5 par ClH 0,1-n. et fournit ainsi un précipité de α_I . Le filtrat ne contient presque plus d'azote protéique.

Le culot de α_{II} brut est suspendu dans de l'eau distillée où il est solubilisé au pH 6, à la concentration de 0,1% et à la force ionique de 2,2 (sulfate d'ammonium). En portant cette solution (devenue déjà trouble par addition de sel minéral) à 40°, on obtient α_{II} pur.

Caséine β : la solution obtenue après centrifugation de la caséine β brute, filtrée éventuellement rapidement à froid, est placée dans une étuve à 40°. Une fois arrivée à cette température, elle s'est troublée avec production d'un précipité de caséine β brute qu'on centrifuge entre 20° et 30°. Les solutions obtenues lors de la reprécipitation de β sont traitées chaque fois de la même manière.

Pour éliminer les derniers restes d' α que β brut contient toujours, il faut travailler en solution beaucoup plus diluée: β brut est solubiisé au pH 6 à l'aide de soude caustique, à une concentration finale de 0,05%. On passe rapidement au pH 4 par addition de ClH 0,1-n., refroidit la solution claire à 2° et précipite le reste d' α par addition de NaOH 0,1-n. goutte à goutte. Après centrifugation à froid, la liqueur claire est portée à 40°, et β pur précipite alors.

Caséine γ : les centrifugeats de la précipitation de la caséine β à 40° contiennent une certaine quantité de caséine γ . Ces solutions sont portées au pH 6 puis additionnées de

Schéma de fractionnement

I. Caséines α et β brutes.

Caséine, sol. à 0,4 – 0,5% au
pH 4,0, portée à 2° à pH 4,6

Précipité, dissous à pH 6, porté
brusquement à pH 4, dilué à 0,4%
et précipité à 2° au pH 4,6

Solution, portée au
pH 4,9 à 40°

Précipité, dissous à pH 6,
etc. comme plus haut (3 ré-
pétitions)

Solution, portée
à pH 4,9 à 40°
Précipité:
caséine β brute

Caséine β brute

Caséine α brute

Fractions successives
de caséine β brute

II. Purification des fractions brutes

Caséine α brute dissoute à 0,5% au
pH 6, add. de 5% de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$,
portée au pH 4,2

Caséines β brutes (ttes fractions
réunies), diss. à 0,05% au pH 6,
portées à pH 4,9 à 2°

Précipité:
caséine α pure

Solution $\gamma + \delta$,
add. de Cl_3COOH 10°.

Précipité:
(caséine α)

Solution,
chauffée à 40°

Précipité:
caséine γ

Solution, pptée
par $\text{MoO}_4(\text{NH}_4)_2$ 5°.

Précipité:
caséine β pure

Solution, add. au
pH 6,0 de 2 vol.
d'acétone

Caséine δ

Précipité, dissous
 H_2O , + $\text{Cl}_2 \text{Ca}$ 0,1-m.
à pH 6,5 à 50°

Solution
contient
caséine δ

Précipité:
caséine γ

III. Séparation de α en α_I et α_{II}

α dissous à 0,3% au pH 6, add. de SO_4
 $(\text{NH}_4)_2$ à 5% ($\mu = 2,2$), porté à 40°

Solution, portée
à pH 4,6

Précipité:
caséine α_I

Précipité:
caséine α_{II} (brute),
suspendu dans eau dist., où
il est dissout à pH 6, conc.
0,1%, $\mu = 2,2$, porté à 40°

Solution
(mélange de α_I et α_{II})

Précipité:
caséine α_{II}

2 volumes d'acétone; il se produit un trouble, puis un précipité qu'on filtre et égoutte sans le sécher, pour le suspendre dans de l'eau distillée. La suspension est amenée au pH 6,5; la solution légèrement opalescente obtenue est additionnée d'une certaine quantité de chlorure de calcium 0,1-m. et portée à 50°, ce qui provoque la précipitation du γ -caséinate de calcium. La suspension de ce sel dans de l'eau distillée est dissoute par addition progressive de NaOH 0,1-n. puis précipitée à 40° au point isoélectrique (5.2) par ClH 0,1-n.

Caséine δ (protéose): le filtrat de la dernière purification de caséine α est additionné de 2 volumes d'acétone. Le précipité filtré et égoutté est repris dans de l'eau distillée et la solution additionnée d'acide trichloracétique à 10%, ce qui précipite le reste de γ ; la caséine δ peut alors être précipitée par exemple par du molybdate d'ammonium à 5%.

Méthodes analytiques.

Dosage de l'azote protéique: par colorimétrie au biuret selon *Baudet & Giddey*¹⁾.

Dosage du phosphore: a) phosphore total: la prise (solution) est évaporée presque à sec dans un matras de 50 cm³ (un produit solide y est introduit tel quel) et désagrégée par 2 cm³ d'acide perchlorique à 60% à chaud. La solution refroidie est portée à 50 cm³. Sur une partie aliquote on dose le phosphore par colorimétrie au bleu de molybdène selon *King*²⁾, sauf que nous avons remplacé l'acide perchlorique à 60% par de l'acide chlorhydrique 5-n. b) Phosphore facilement hydrolysé: le produit examiné est traité en solution dans NaOH 0,75-n. à 40° pendant 12 heures. On précipite ensuite les protides par addition d'un volume d'acide trichloracétique à 20%. On filtre sur une triple couche de papier-filtre. Dans le filtrat qui doit être limpide, on dose le phosphore selon *King* (comme plus haut) dans une partie aliquote.

Humidité: elle a été déterminée indirectement par dosage colorimétrique de l'azote dans une prise de matière séchée à la température ordinaire à l'air. Pour les protides anhydres nous avons admis une teneur en azote de 16,0%.

Dosage de la tyrosine et du tryptophane: ces acides aminés ont été dosés par spectrophotométrie (spectrophotomètre DU de *Beckman*) selon *Goodwin & Morton*³⁾.

Electrophorèses: elles ont été effectuées sur des solutions obtenues par dissolution directe du protide dans le tampon véronal/ClH de force ionique de 0,1, de pH 7,8 ou 7,6, dialysées trois jours à 4° contre le tampon, avec un appareil à système optique *Philpot-Svensson*.

Nous remercions vivement M. P. *Bernfeld*, privatdocent à l'Université de Genève, de l'aide précieuse apportée dans l'examen électrophorétique de nos produits.

RÉSUMÉ.

Dans le mélange constituant la caséine du lait de vache, nous distinguons à côté des fractions α et β , décrites déjà par *Warner*, encore une fraction γ et une fraction δ (cette dernière identique à la protéose de *Hammarsten*). La fraction α se dédouble en α_I et α_{II} par précipitation à 40° en présence de sulfate d'ammonium.

Les sels calciques de β et de γ , insolubles aux pH respectivement de 5 et de 6, jusqu'au delà de la neutralité, sont maintenus en solution par le sel calcique de α ; ce dernier agit donc comme colloïde protecteur, ce qui confirme une hypothèse déjà ancienne de *Linderstrom-Lang*. Par ailleurs, des arguments sont donnés qui rendent probable l'existence d'une combinaison entre caséines α et β .

¹⁾ Helv. **31**, 1879 (1948).

²⁾ Biochem. J. **26**, 202 (1932).

³⁾ Biochem. J. **40**, 628 (1946).

On ne sait encore que peu de chose sur la transformation de la caséine en paracaséine sous l'influence du labferment (présure), en dehors de la constatation que l'enzyme transforme la caséine (soluble sous forme de sel calcique) en un produit dit paracaséine, caractérisé par l'insolubilité de son sel de calcium, l'action enzymatique elle-même étant indépendante de la présence d'ions Ca^{++} . La conception d'une hydrolyse partielle, opérée par l'enzyme, a été abandonnée; en effet, la protéose de *Hammarsten*, dont l'apparition après emprésurage de la caséine semblait étayer cette idée, est un des constituants préformés de la caséine²⁾ et ne joue aucun rôle dans la coagulation du lait (ou d'une solution de caséinate de calcium) sous l'influence du ferment. La caséine étant un mélange de plusieurs protides, *Linderstrom-Lang*³⁾ a pensé que l'enzyme transforme un des constituants qui jouerait le rôle de colloïde protecteur, de manière à rendre insoluble son sel calcique; la précipitation de ce dernier entraînerait celle des autres constituants. Pour *Berridge*⁴⁾, il s'agirait d'une sensibilisation du caséinate de calcium à une dénaturation par la chaleur. Les travaux de *Nitschmann & Lehmann*⁵⁾, reprenant l'hypothèse de *Linderstrom-Lang*, tendent à confirmer cette dernière. Notre mémoire précédent¹⁾ démontre l'existence de ce colloïde protecteur: la caséine α dont le sel calcique soluble maintient en solution les sels calciques (insolubles en eux-mêmes) des caséines β et γ .

¹⁾ Vme communication, *Helv.* **33**, 398 (1950).

²⁾ *E. Cherbuliez & J. Jeannerat*, *Helv.* **22**, 959 (1939).

³⁾ *C. r. Trav. Lab. Carlsberg* **17**, No. 9 (1928).

⁴⁾ *N. J. Berridge*, *Nature (London)* **40**, 194 (1942).

⁵⁾ *Helv.* **30**, 804 (1947).

Cette transformation enzymatique de la caséine peut d'ailleurs résulter encore de l'action d'autres ferments, notamment de la pepsine¹⁾, de la chymotrypsine²⁾, de la papaïne³⁾, de la trypsine⁴⁾. On ignore toutefois si les paracaséines engendrées dans ces transformations sont identiques entre elles et à la caséine labique.

Pour serrer le problème, nous avons appliqué les procédés de fractionnement développés pour la caséine, d'un côté aux produits d'emprésurage de la caséine et de ses diverses fractions, et de l'autre aux produits résultant de l'action coagulante de divers autres enzymes sur la caséine.

I. Fractionnement de la paracaséine labique.

On peut préparer des solutions de paracaséine de deux manières: incubation, par la présure, d'une solution de caséinate de sodium au pH 5,5—6,5 à 40°; ou bien traitement d'une solution de caséinate calcique par la présure et décalcification du paracaséinate de calcium (par traitements acides suivis de dissolutions au pH 7 et reprécipitations acides), suivie d'une dissolution finale dans de la soude caustique très diluée. Ce dernier procédé, plus long, fournit une paracaséine exempte de caséine δ (protéose) mais contenant encore des traces de calcium⁵⁾. Comme la protéose de *Hammarsten* ne gêne aucunement le fractionnement ultérieur, nous avons utilisé généralement le premier procédé qui fournit directement des solutions des sels sodiques des divers constituants de la paracaséine, solutions qui se prêtent au fractionnement.

Traitées comme les solutions de caséinate de sodium (voir partie expérimentale), ces solutions de paracaséinate de sodium fournissent de nouveau 4 constituants, correspondant aux caséines α , β , γ et δ ; on observe toutefois que maintenant, la séparation des fractions des types α et β est beaucoup plus aisée que pour la caséine, point sur lequel nous reviendrons encore. Examinant les diverses fractions, on constate alors que seule, la caséine α a subi une transformation en paracaséine α , les autres constituants de la caséine se retrouvant inchangés.

a) Paracaséine α .

Après emprésurage normal (au pH 6,2) de la caséine ou de sa fraction α , on obtient la paracaséine α par précipitation au pH 4,7 à 2°. Elle présente la même composition que la caséine α , mais elle s'en distingue notamment par l'insolubilité de son sel calcique (en présence d'un excès d'ions calcium) (voir tableau 1).

¹⁾ J. H. Northrop & M. Kunitz, J. gen. Physiol. **16**, 267 (1932).

²⁾ M. Kunitz & J. H. Northrop, J. gen. Physiol. **18**, 433 et 459 (1934).

³⁾ A. K. Balls & Sam. R. Hoover, J. Biol. Chem. **121**, 737 (1937).

⁴⁾ Henri Tauber & Israel S. Kleiner, J. Biol. Chem. **104**, 271 (1934).

⁵⁾ Cherbuliez & Jeannerat, Helv. **22**, 952 (1939).

Comme α^1 , para α est formé de deux constituants, para α_1 et para α_2 , mais qui sont plus faciles à séparer que α_1 et α_{11} : à l'électrophorèse, dans des conditions où la caséine α se comporte comme un corps homogène (concentration supérieure à 1 %, pH au moins 7, $\mu = 0,1$), para α présente déjà deux gradients ascendants, correspondant aux paracaséines α_1 et α_2 dans l'ordre de mobilité anodique décroissante (fig. 1).

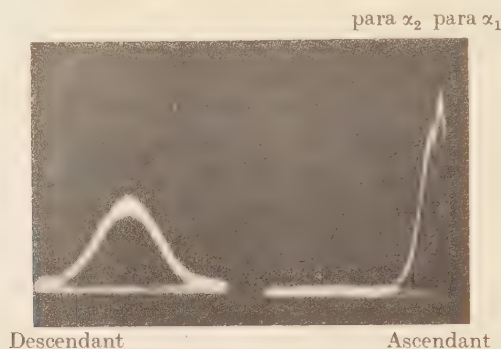


Fig. 1.

Diagramme électrophorétique de para α , pH 7,3; $\mu = 0,1$ (tampon de *Michaelis*); 4°; concentration 1,3%; 4,64 volt/cm; durée 15000 secondes.

On peut séparer (du moins approximativement) ces deux constituants par précipitation en fonction du pH en présence de sulfate

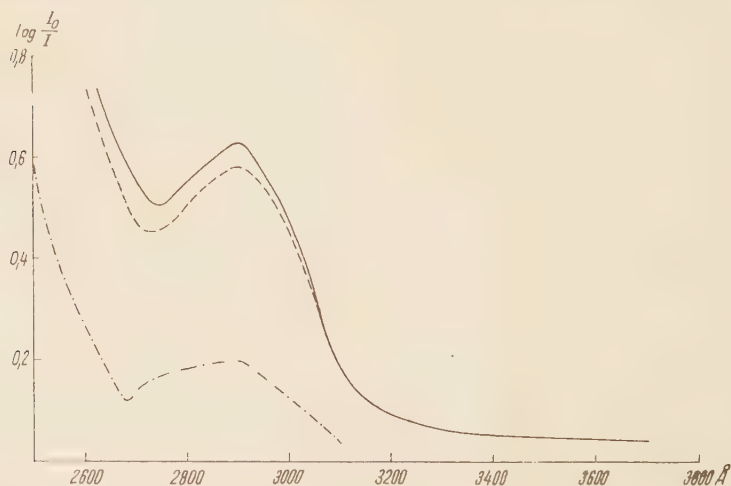


Fig. 2.

Spectres UV. des caséines para α_1 et para α_2 , et de la caséine β retirée de la paracaséine (spectrophotomètre photoélectrique *Beckman DU* à quartz). Concentrations en protéines 0,320 mg/cm³; pH 12; cuves de 10 mm.

———— para α_2 - - - - - para α_1 - - β

¹) Cf. *Cherbuliez & Baudet, Helv. 33, 398 (1950).*

d'ammonium ($\mu = 2,0$) et par précipitation en fonction de la température à pH constant, à la force ionique 2,2. Quelques caractéristiques des fractions para α_1 et para α_2 sont consignées dans le tableau 1 à côté de celles de para α ; les différences de leurs teneurs en tyrosine et en tryptophane sont révélées notamment par le spectre UV. (voir fig. 2). D'après l'examen électrophorétique, para α_2 telle que nous l'avions obtenue contenait encore environ 15% de para α_1 (voir fig. 3).

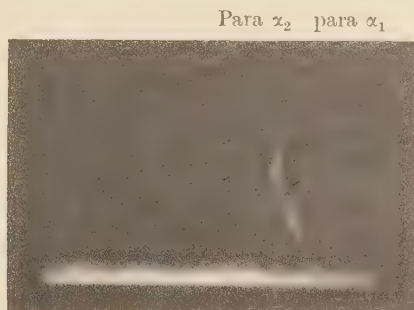


Fig. 3.

Diagramme électrophorétique de para α_2 , gradient ascendant, pH 7,3; $\mu = 0,1$ (tampon de *Michaelis*); 4°; concentration 0,25%; 3,08 volt/cm; durée 10800 secondes.

Tableau 1.

	para α	para α_1	para α_2 (avec env. 15% de para α_1)
Point isoélectrique	4,7	4,5	5,1
Solub. du sel sodique	solut. claire	solut. claire	solut. claire
Solub. du sel calcique (30°, pH 5—7,5) .	insol.	insol.	insol.
Solub. ds $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ aq. ($\mu = 2,2$; pH 6; 40°)	solub. part.	soluble	insol.
Phosphore (après hydrol. alcal. ménagée ou après désagré. perchlorique) . . .	1,1%	1,6%	0,85% ¹⁾
Tyrosine	8,4%	7,5%	8,7% ¹⁾
Tryptophane	1,7%	1,4%	1,8% ¹⁾
Mob. électrophor. en $\text{cm}^2 \text{sec}^{-1} \text{volt}^{-1}$ à $\mu = 0,1$ sous 3,08 volt/cm au pH 7,3 .		$6,5 \cdot 10^{-5}$	$5,8 \cdot 10^{-5}$ ²⁾

¹⁾ Si la para α_2 obtenue contient encore 15—18% de para α_1 , comme le résultat de l'électrophorèse semble l'indiquer, les teneurs en phosphore, en tyrosine et en tryptophane de para α_2 pure seraient respectivement de 0,70%, 9,0% et 1,9%.

²⁾ La mobilité électrophorétique est calculée à l'aide du gradient homogène et se rapporte donc à para α_2 pure.

Rapports entre caséines α_I et α_{II} et paracaséines α_1 et α_2 . Lorsqu'on soumet séparément à l'action du labferment les fractions α_I et α_{II} de la caséine, on observe chaque fois leur transformation intégrale en des corps dont les sels calciques sont insolubles. Mais α_I et α_{II} ne donnent nullement naissance à des produits homogènes; dans chaque cas, on obtient un mélange de para α_1 et de para α_2 , dans des proportions caractéristiques et différentes pour α_I et pour α_{II} , α_I fournissant davantage de para α_1 que la fraction α_{II} (α_I : environ 50 % de para α_1 et 50 % de para α_2 ; α_{II} : environ 35 % de para α_1 et 65 % de para α_2) (proportions calculées d'après les teneurs en phosphore, en tyrosine et en tryptophane des diverses fractions, les teneurs observées pour para α_2 telle qu'elle a été obtenue étant corrigées en tenant compte de 15 % de para α_1 probablement encore présents dans notre produit).

Au cours de la séparation de la paracaséine en para α_1 et para α_2 , cette dernière fraction précipite en premier lieu. Lorsque par élimination d'une certaine quantité de para α_2 , le mélange résiduel a été enrichi en para α_1 de manière à en contenir plus de 50 %, on constate que la séparation électrophorétique des deux constituants de para α devient beaucoup plus lente (v. fig. 4; image après 5 h. d'électrophorèse). Ce phénomène s'explique peut-être par une forme très allongée des molécules des caséines para α_1 et para α_2 , ce qui entraverait la mobilité par suite des grandes possibilités de contact et d'enchevêtrement, comme le suggèrent les observations de *Signer*¹⁾ sur la séparation électrophorétique de mélanges d'acide nucléique et de méthylcellulose.

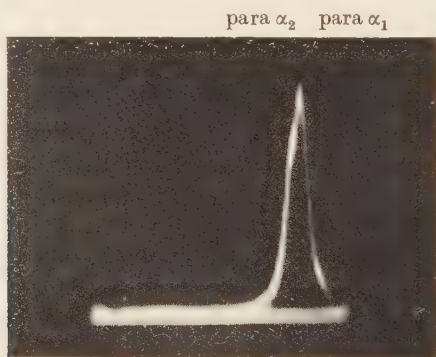


Fig. 4.

Diagramme électrophorétique d'une caséine para α dans laquelle le rapport para α_2 /para α_1 a été abaissé au-dessous de 1; pH 7,3; $\mu = 0,1$ (tampon de *Michaelis*); 4°; 3,08 volt/cm; durée 18000 secondes; gradient ascendant.

Les choses se passent donc comme si les caséines α_I et α_{II} étaient représentées par des associations, en des proportions différentes mais déterminées, des deux mêmes protéines para α_1 et para α_2 , associations qui subiraient sous l'influence du ferment une scission en ces derniers constituants. Ici, il s'agirait donc d'entités chimiques et non pas d'une association fonction des concentrations comme dans le cas des asso-

¹⁾ *R. Signer & Brechbühler*, Bl. Soc. Chim. Belg. **57**, 163 (1948).

ciations entre α et β^1). Les teneurs en P, tyrosine et tryptophane, observées pour les caséines α_1 et α_{II} aussi bien que pour para α_1 et para α_2 sont parfaitement compatibles avec cette hypothèse.

b) *Les fractions β , γ et δ .*

La fraction β de la paracaseïne = caséine β . Après élimination de la paracaseïne α au pH 4,7 à 2°, on obtient par élévation de la température à 40° une fraction correspondant à la caséine β . Le cours des opérations se distingue ici de ce qu'on observe pour la caséine native, en ce sens que la séparation des fractions α et β est beaucoup plus aisée. Cette fraction β se trouve être identique à la caséine β , comme le montre le tableau 2 consignant quelques caractéristiques de la caséine β retirée de la paracaseïne (cf. les propriétés identiques de la caséine β isolée d'une caséine native, ce volume p. 399).

Tableau 2.
Propriétés de la caséine β retirée de la paracaseïne.

Point isoélectrique	4,9
Solub. du sel sodique (pH 5 à 7,5)	sol.; solution claire ou trouble, selon son âge
Solub. du sel calcique (pH 5 à 7,5)	insoluble
Solub. ds tampon lactique de pH 3; $\mu = 0,1$	insoluble
Phosphore (après hydr. alcal. ménagée ou après dés-agrég. perchlorique)	0,60%
Tyrosine	2,6%
Tryptophane	0,85%
Mobilité électrophor. à pH 7,6, $\mu = 0,1$, avec 2,91 volt/cm	$2,9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1} \text{ volt}^{-1}$

L'homogénéité de cette caséine est confirmée par l'électrophorèse (fig. 5). Spectre UV., voir fig. 2.

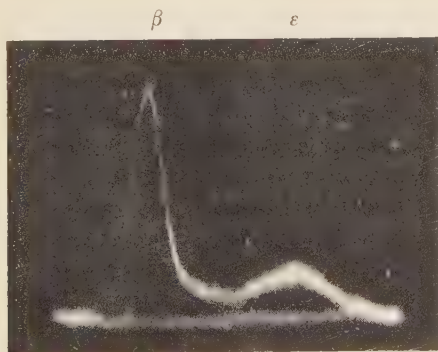


Fig. 5.

Diagramme électrophorétique de caséine β retirée de la paracaseïne, gradient descendant; pH 7,6; $\mu = 0,1$ (tampon de *Michaelis*); concentration 0,8%; 4°; 2,91 volt/cm; durée 14400 secondes.

¹⁾ R. Warner, Am. Soc. **66**, 1725 (1944); E. Cherbuliez & P. Baudet, Helv. **33**, 398 (1950).

La plus grande facilité de séparation de para α et de β résulte uniquement de la transformation labique de la caséine α , sans participation des autres fractions: un mélange de caséines α et β — mélange qui ne se laisse séparer que par un fractionnement opéré en solution très diluée — donne, après emprésurage, dès la première opération de séparation des fractions β pures.

Les fractions γ (caséine γ) et δ (caséine δ ou protéose). Ces deux fractions sont obtenues comme dans le cas de la caséine native; elles présentent les caractères respectivement de la caséine γ et de la caséine δ (protéose).

Il résulte de ce qui précède que le labferment produit au pH normal de son activité une modification de la caséine portant exclusivement sur les caséines α_I et α_{II} (dont les sels calciques sont solubles); celles-ci sont transformées en paracaséines α_1 et α_2 (dont les sels calciques sont insolubles); en présence d'ions calcium, la précipitation des paracaséinates α_1 et α_2 de calcium entraîne celle des sels calciques des caséines β et γ , la caséine δ (protéose de Hammarsten) restant en solution.

La composition des caséine et paracaséine de laits de mélange se présente en chiffres ronds comme suit:

Caséine		Paracaséine	
$\alpha (\alpha_I + \alpha_{II})$	60% sels calc. solubles . . .	para α_1	24%
β	25% } sels calc. insol. mais	para α_2	36%
γ	10% } peptisés par α		25%
δ	5%		10%
			(5%, soluble)

II. Action coagulante comparée du labferment et d'autres enzymes.

a) *Labferment et pepsine.* Le labferment, brut et cristallisé, ainsi que la pepsine nous ont toujours donné le même résultat entre les pH 5,5 et 6,8: transformation de la caséine α ($\alpha_I + \alpha_{II}$) en paracaséine α (para $\alpha_1 +$ para α_2), sans attaque des autres constituants de la caséine. On sait que ces enzymes exercent leur action coagulante sur la caséine à des pH situés en dehors des limites dans lesquelles on observe une action protéolytique proprement dite. Que se passe-t-il au-dessous du pH 5,5?

Lorsque du caséinate de sodium est incubé au pH 5,0—5,1, à 37°, avec du labferment ou de la pepsine, on constate tout d'abord que la solution trouble devient laiteuse pour être limpide au bout d'une demi-heure. Le pH est alors de 6,2. Additionnée maintenant de chlorure de calcium, la liqueur précipite; filtrée à 40°. Elle donne un filtrat

claire qui ne se trouble que légèrement vers 80°, mais qui donne une précipitation abondante avec l'acide trichloracétique. La partie précipitée par les ions calcium ne représente qu'environ 40% de la caséine mise en oeuvre. Le fractionnement systématique des sels calciques insolubles permet d'en retirer de la para α_2 , seule fraction identique aux protéines qu'on retrouve après l'emprésurage normal: tout le reste est constitué par des protéines dont les sels calciques sont solubles: il y a eu une dégradation probablement protéolytique (nous n'en avons pas encore examiné la nature) qui accompagne l'action coagulante due de nouveau à la modification de la caséine.

b) *Chymotrypsine*. D'après Kunitz¹⁾, cette protéinase hydrolyse la caséine entre les pH 5,6 et 8, mais aux pH 5,0 à 5,1 elle coagulerait le lait sans protéolyse.

D'après nos observations, le produit de la transformation du caséinate de sodium sous l'influence de la chymotrypsine à ces derniers pH, à 37°, est très hétérogène. Les ions calcium n'y précipitent que 42% de l'azote protéique (contre 95% dans l'emprésurage normal), le filtrat contenant abondamment des produits précipitant à l'acide trichloracétique. Le précipité calcique est notamment exempt de β ; à l'électrophorèse, la partie des sels calciques qui précipite au pH 4,4 est décomposée en au moins 5 fractions; l'application de notre procédé de fractionnement permet d'en retirer uniquement une certaine quantité de para α_2 , tout le reste étant constitué par des protéines dont les sels calciques sont solubles, mais qui ont été entraînés d'abord par le paracaséinate α_2 de calcium. Donc, tout en provoquant la transformation de la caséine α en paracaséines α_1 et α_2 , la chymotrypsine, au pH de coagulation, modifie déjà profondément les diverses fractions de la paracaséine, dont subsiste intacte seulement une certaine partie de para α_2 .

c) *Papaïne*. On connaît depuis quelque temps l'action coagulante de la papaïne sur le caséinate de calcium²⁾. Nous n'avons toutefois pas trouvé d'indications sur la nature de la paracaséine papainique. Comme l'action hydrolysante³⁾ de cet enzyme s'étend sur un large intervalle de pH (2,5—7,0), qui comprend la zone d'action coagulante²⁾ (pH 6—6,5), il était à prévoir que la coagulation (en présence d'ions Ca^{++}) se compliquerait d'une dégradation protéolytique. Mais la coagulation de la caséine par la papaïne est très fortement activée par le cyanure; en incubant par conséquent du caséinate de calcium au pH 6,0, à 37°, avec de la papaïne activée et en inactivant le ferment dès

¹⁾ M. Kunitz & J. H. Northrop, J. gen. Physiol. **18**, 433 et 459 (1934).

²⁾ A. K. Balls & Sam R. Hoover, J. Biol. Chem. **121**, 737 (1937).

³⁾ S. R. Hoover & E. L. C. Kokes, J. Biol. Chem. **167**, 199 (1947).

la floculation (après 10 minutes) au moyen d'eau oxygénée, on pouvait espérer réduire à un minimum la dégradation protéolytique proprement dite.

On n'en constate pas moins une profonde altération de la caséine primitive, dont 55 % seulement sont précipités; le filtrat ne contient que des protéines ne précipitant plus avec l'ion calcium même aux températures élevées, tout en étant encore précipitées par l'acide trichloracétique. Quant au précipité calcique, il se révèle composé, comme dans le cas de la chymotrypsine, de protéines ne précipitant seules à aucun pH et donnant des sels calciques solubles, à côté d'une certaine quantité de para α_2 , unique constituant de la paracaséine labique dont on retrouve une partie.

III. Essai d'interprétation des résultats.

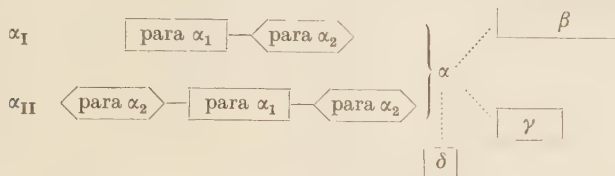
La caséine du lait de vache est constituée par une association de protéines diverses, soit des caséines $\alpha_I + \alpha_{II}$, β , γ et δ , dont les caséines α sont le «noeud». Cette association se manifeste notamment par trois faits: d'un côté, les sels calciques des caséines β et γ , insolubles en eux-mêmes, sont maintenus en solution par les sels calciques des caséines α , qui sont solubles; de l'autre, malgré les points de précipitation différents de α_I , α_{II} , β et γ et la solubilité de δ à tous les pH, toutes ces fractions sont précipitées ensemble, à la température ordinaire, au pH 4,6; finalement, lorsqu'on élimine par un procédé de fractionnement approprié les caséines α ou lorsque ces caséines α sont altérées par l' emprésurage, la séparation des autres fractions les unes des autres devient facile.

La transformation labique aux pH compris entre 5,5 et 6,8 ne semble porter que sur les fractions α , les autres fractions (β , γ et δ) restant inchangées. Dans cette réaction, les fractions α_I et α_{II} (dont le mélange se comporte dans certaines conditions de pH et de concentration comme une protéine homogène) sont transformées chacune en un mélange des paracaséines α_1 et α_2 dont les sels calciques sont insolubles, la caséine α_I fournissant davantage de para α_1 que la caséine α_{II} (caséine α_I : environ parties égales de para α_1 et para α_2 ; caséine α_{II} : environ 1 partie de para α_1 pour 2 parties de para α_2). Les paracaséines α_1 et α_2 étant précipitées par l'ion calcium, toutes les fractions de la caséine primitive donnant des sels calciques insolubles (soit β et γ aussi bien que para α_1 et para α_2) précipitent en présence d'ions Ca^{++} sous forme du mélange appelé paracaséine, la caséine δ restant en solution et constituant la protéose de *Hammarsten*. Voici une représentation schématique de cette transformation (v. p. 1682).

Dans ce schéma, deux points restent à préciser: la nature du lien responsable de l'association entre les α d'un côté et β , γ et δ de l'autre

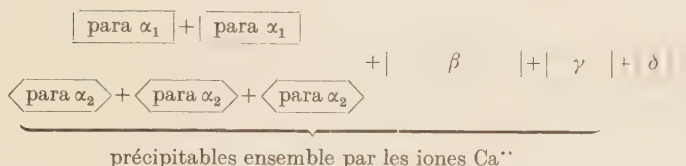
dans la caséine native, et la nature de la réaction que subissent respectivement α_I et α_{II} dans l'empréurage qui les transforme chacune en un mélange de para α_1 et para α_2 .

Caséine



Labferment ou pepsine à pH 5,5—6,8

Paracaséine



Sur le premier point, nous ne pouvons formuler encore aucune hypothèse.

Quant au second, on peut supposer — comme cela est suggéré dans le schéma — que l'apparition des fractions para α_1 et para α_2 est le résultat d'une scission des molécules des caséines α_I et α_{II} . Comme cette transformation est effectuée par l'enzyme à un pH où il n'exerce pas d'action sur les liens peptidiques, on peut penser à l'intervention de groupes de nature différente, par exemple ester ou amide, groupes qui pourraient intéresser les restes phosphoriques. On sait en effet que la caséine déphosphorylée forme un sel calcique donnant des solutions aqueuses limpides; après rephosphorylation, les solutions des sels calciques retrouvent l'apparence laiteuse primitive; on sait aussi que la sérum-globuline (pas précipitable par Ca^{++}) devient précipitable par l'ion calcium après phosphorylation¹). Si la formation des paracaséines α_1 et α_2 s'accompagnait d'une libération de fonctions phosphoriques salifiables, l'apparition de l'insolubilité de leurs sels calciques serait explicable, l'augmentation du nombre de restes phosphoriques salifiés par Ca^{++} accroissant la tendance à l'association jusqu'à amener la précipitation.

Cette hypothèse implique celle de l'augmentation des fonctions acides sous l'influence du labferment. Après avoir été affirmée²), cette

¹) C. Rimington, Bioch. J. **21**, 272 (1927), C. Neuberg & W. Oertel, Bioch. Z. **60**, 491 (1914).

²) Cf. p.ex. L. L. van Slyke & Bosworth, J. Biol. Chem. **14**, 203 (1913).

augmentation a été contestée plus récemment¹⁾. De toute manière, une faible augmentation de l'acidité — si on table sur un poids moléculaire de l'ordre de 130 000 pour la caséine α , et sur un poids moléculaire moyen des paracaséines α_1 et α_2 de l'ordre de 26 000, l'augmentation de fonctions acides devrait être au minimum de 3 pour un poids de 130 000 d'après notre schéma, c'est-à-dire de 1 fonction sur un poids de 5000 — est délicate à constater au titrage à cause de la difficulté de débarrasser ces protéines des dernières traces de cendres. En effet, un équivalent de calcium (20) sur 45 000 représente seulement 0,05 % Ca^{2+}).

Aux pH inférieurs à 5,5, une action de dégradation protéolytique vient s'ajouter à l'action emprésurante proprement dite du labferment.

La pepsine a une action analogue à celle du labferment lorsqu'elle agit à des pH de l'ordre de 5,5—6,6; aux pH plus bas (pH 5), l'action hydrolysante se fait sentir en plus; dans ce dernier cas, seule une certaine quantité de para α_2 subsiste alors intacte, à côté de produits dont les sels calciques, solubles en eux-mêmes, sont entraînés partiellement lors de la précipitation du paracasinat α_2 de calcium. Dans le cas de la chymotrypsine et de la papaïne, l'action «emprésurante» (transformation des caséines α en para α_1 et para α_2) s'accompagne toujours d'une dégradation marquée en produits dont les sels calciques sont solubles, à l'exception d'une certaine quantité de para α_2 qui, ici encore, subsiste.

Partie expérimentale.

I. Fractionnement de la paracaséine labique et de ses constituants.

Préparation des solutions de paracasinat de sodium. Une solution de caséine (préparée selon nos indications antérieures²⁾) à 2% au pH 6,2, préparée à l'aide de soude caustique 0,1-n. ajoutée à la suspension aqueuse de la caséine, est incubée à 40° pendant 15 min. avec du labferment. L'enzyme peut être inactivé par une chauffe de 10 min. à 80°, mais pratiquement, cette opération ne s'est pas révélée nécessaire.

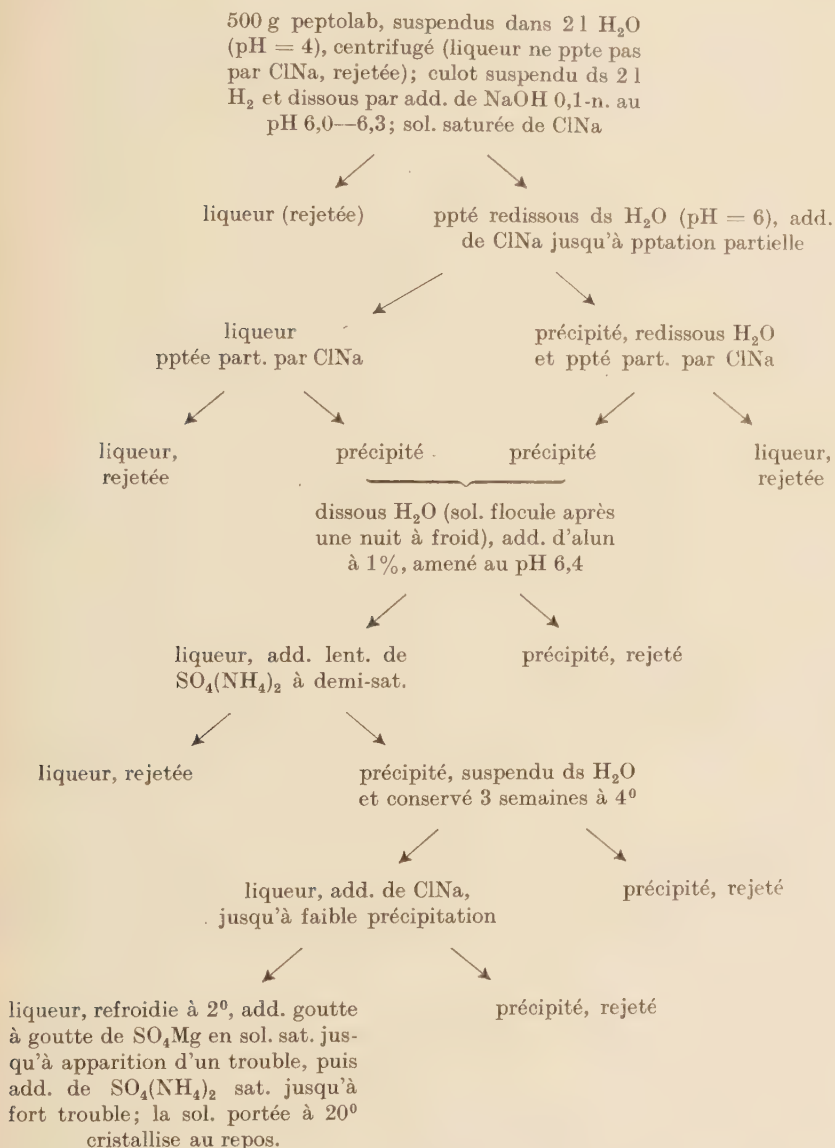
Labferment utilisé: nous avons utilisé soit une préparation commerciale liquide, provenant de la Maison *Hansen* (Danemark) et contenant 0,20% de protéines, soit une présure en poudre «peptolab» de la Maison *Spöhr* à Lugano, contenant 13% de protéines. Pour 500 cm³ de solution de caséine à 2%, on a utilisé soit 1 cm³ de présure *Hansen*, soit une quantité équivalente (par son pouvoir emprésurant) de peptolab ou de labferment

¹⁾ *Holter*, *Bioch. Z.* **255**, 160 (1932).

²⁾ *E. Cherbuliez & J. Jeannerat*, *Helv.* **22**, 952 (1939), ont constaté que le paracasinat de calcium, décalcifié par un traitement prolongé à l'acide chlorhydrique 0,1-n., suivi d'une triple dissolution au pH 4 et précipitation isoélectrique au pH 4,6, fournissait une paracaséine contenant encore 0,19% Ca .

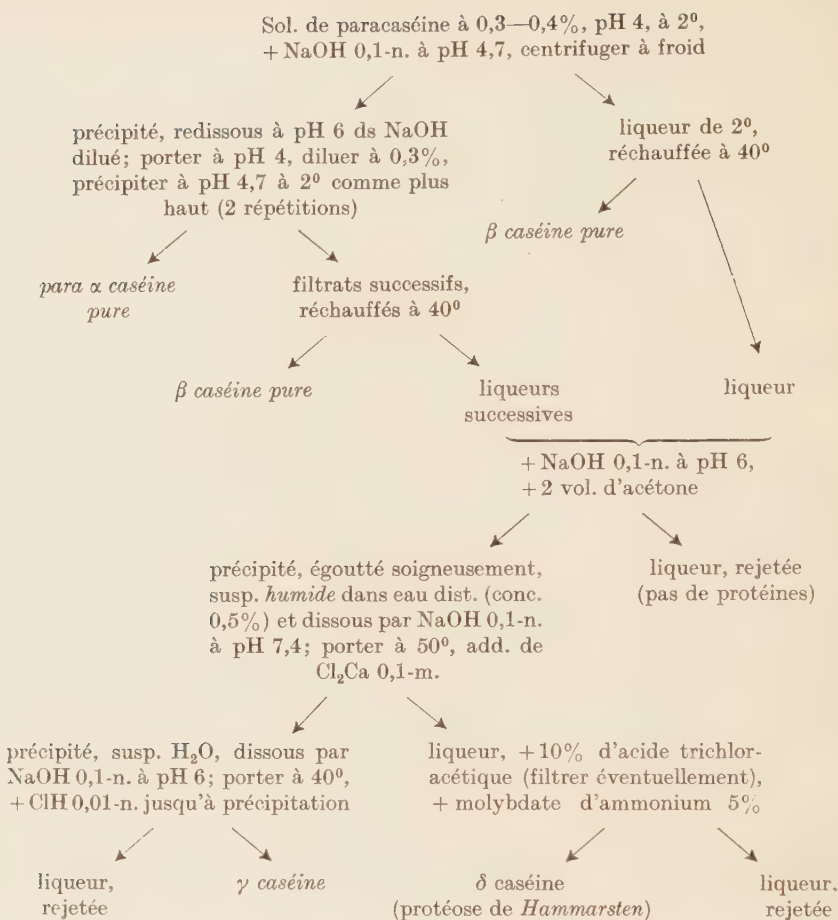
³⁾ *Helv.* **33**, 398 (1950).

cristallisé. Ce dernier a été préparé essentiellement d'après *Berridge*¹⁾ à partir de peptolab, selon le schéma suivant:

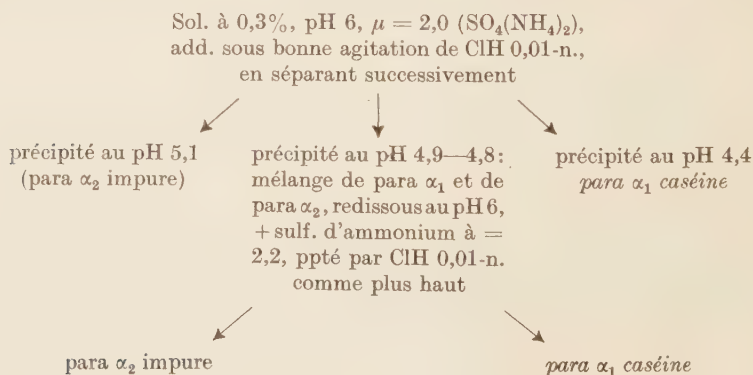


Fractionnement de la paracaséine. La solution de paracaséinate de sodium, refroidie à 2°, est portée brusquement au pH et diluée (toujours à 2°) de manière à contenir 0,3 - 0,4% de protéines, puis soumises aux opérations suivantes:

¹⁾ Biochem. J. **39**, 179 (1945).



Fractionnement de la para α caséine et des produits d'emprésurage des caséines α_1 et α_{11} . On prépare une solution à 0,3% du produit à fractionner, au pH 6, qu'on additionne de sulfate d'ammonium de manière à porter la force ionique à 2 (5%) et procède comme suit:



Les fractions para α_2 impures sont réunies, dissoutes à 0,3% au pH 6, additionnées de sulfate d'ammonium à $\mu = 2,2$ et la solution est portée à 30°

liqueur
rejetée

précipité, dissous H_2O , puis add.
de ClH 0,1-n. jusqu'à flocul.

liqueur,
rejetée

précipité, dissous H_2O , porté à pH 6,
+ $SO_4(NH_4)_2$ à $\mu = 2,2$, puis porté à 40°

liqueur (presque
exempte de pro-
téines), rejetée

précipité, dissous H_2O ,
+ ClH 0,1-n. jusqu'à
floculation

liqueur (presque exempte
de protéines), rejetée

précipité:
para α_2

La paracaséine α ainsi que les produits d'emprésurage des caséines α_I et α_{II} se comportent qualitativement de la même manière; seules les proportions de para α_I et para α_2 obtenues varient.

II. Fractionnement des «paracaséines» obtenues dans d'autres conditions.

a) *Labferment et pepsine au pH 5,0—5,1*, et b) *chymotrypsine au pH 5,0—5,1*.

Enzymes utilisés: pepsine: produit commercial en poudre; chymotrypsine: produit cristallisé *Armour* (Chicago), contenant 50% de sulfate de magnésium.

Dans ces opérations conduites dans des conditions où une dégradation protéolytique se superpose à l'action labique proprement dite, nous avons séparé d'abord, après action du ferment, puis inactivation de ce dernier, les fractions précipitables par le chlorure de calcium, pour fractionner celles-ci ensuite. Voici le schéma de ces opérations, indiqué en détail pour la chymotrypsine:

250 cm^3 de caséinate de sodium à 1,8%, de pH 5,1, reçoivent à 40° 7 cm^3 d'une solution de chymotrypsine à 0,05%. Après 15 min. d'incubation, la solution fortement blanchie est portée 5 min. à 80° pour l'inactivation de l'enzyme. Après refroidissement, on ajoute $NaOH$ 0,1-n. jusqu'au pH 6,4, ce qui clarifie la liqueur:

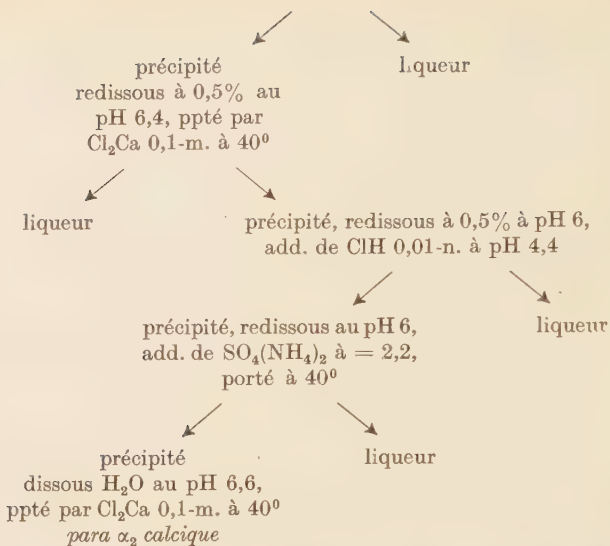
Sol. de «paracaséinate de sodium»,
pH 6,4, à 40° add. de Cl_2Ca 0,1-m.

précipité (42% du N protéique) re-
dissous à 0,5% dans eau avec $NaOH$
0,1-n. au pH 6, puis porté rapide-
ment par ClH 0,1-n. à pH 4, refroidi
à 2°, + $NaOH$ 0,1-n. à pH 4,4

liqueur (58% du N protéique),
forte précipitation par
 CCl_3COOH 20%

précipité, redissous à pH 6,
porté à pH 4,4 par ClH
0,01-n.

liqueur exempte de β et γ
(pas de précipitation cal-
cique) mais à réaction tri-
chloracétique positive



Le précipité de sel calcique de para α₂ est transformé en para α₂ libre par deux dissolutions à 0,3% dans de l'eau à l'aide de soude diluée à un pH ne dépassant pas 7, suivies de deux précipitations par ClH 0,01-n. au pH 5,1, la dernière précipitation ne laissant pratiquement rien dans les eaux-mères.

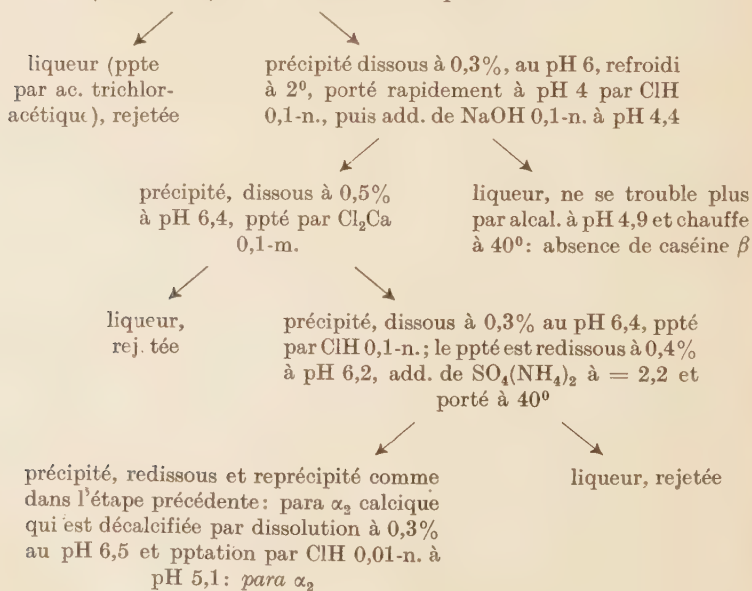
c) *Papaïne activée à pH 6.*

Enzyme utilisé: produit commercial en poudre.

Traitement de la caséine par la papaïne: v. p. suivante.

Fractionnement des protéines du précipité calcique.

Précipité dissous ds eau au pH 6,3, à la concentration de 0,4%
(sol. trouble), add. de ClH 0,1-n. à pH 4,3



Traitement de la caséine par la papaine. 300 cm³ d'une solution de caséinate de sodium à 1,8% reçoivent 30 cm³ de chlorure de calcium 0,1-n., sont ajustée à pH 6 et portées à 40°. On y introduit 7 cm³ d'une solution de papaine à 0,05%, activée par 0,5 cm³ CNK à 1%. Dix minutes après l'introduction du ferment, il y a coagulation. On inactive alors la papaine par addition de 2 cm³ H₂O₂ à 3%. Le coagulum contient 55% de l'azote protéique mis en œuvre. La liqueur, qui ne se trouble pas même à 80°, est fortement précipitée par l'acide trichloracétique à 20%, mais ne présente aucune précipitation par simple acidulation. (Schéma, v. p. précédente.)

III. Méthodes analytiques: cf. notre mémoire précédent¹⁾.

Quant au dosage du phosphore, il nous paraît utile d'insister sur l'importance du pH et du temps dans le phénomène de déphosphorylation de la caséine et de ses constituants. Tant que le pH ne dépasse pas 7, on n'observe aucune minéralisation de phosphore protéique, même après plusieurs jours à la température ordinaire (en présence de thymol, à l'abri des poussières). Cependant une fraction de paracaséine, dialysée dans un tampon au véronal au pH 7,8, a perdu après 14 jours 0,3% de phosphore. Après cette dialyse, le diagramme électrophorétique de cette fraction a montré une hétérogénéité, absente dans la même fraction après seulement trois jours de dialyse dans les mêmes conditions. Il faut donc éviter de maintenir d'une manière prolongée des solutions de caséine à des pH même inférieurs à 8, mais voisin de ce pH.

RÉSUMÉ.

Parmi les constituants de la caséine du lait de vache, seul le groupe α (α_I et α_{II}) subit une transformation lors de la transformation labique normale à un pH compris entre 5,5 et 6,8; les composants de ce groupe, α_I et α_{II} , sont scindés chacun en paracaséines α_1 et α_2 , dont les sels calciques sont insolubles. L'effet de colloïde protecteur de la caséine α étant supprimé, il y a précipitation, en présence d'ions Ca⁺⁺, des paracaséines α_1 et α_2 avec les caséines β et γ , la caséine δ restant en solution et constituant la protéose de *Hammarsten*.

La coagulation par la pepsine, réalisée à un pH de 5,5–6,6, est analogue à celle du labferment; à un pH plus bas (5,0–5,1) par contre, elle s'accompagne d'une dégradation protéolytique proprement dite qui ne laisse subsister qu'une certaine partie de para α_2 .

L'action coagulante de la chymotrypsine et de la papaine est analogue à celle de la pepsine à pH 5; ici, la dégradation protéolytique partielle est inséparable de la coagulation.

Comme mécanisme de la transformation des caséines α_I et α_{II} en para α_1 et en para α_2 et comme cause de l'insolubilité des sels calciques de ces derniers constituants, on propose l'hypothèse d'une scission dégageant des groupes phosphoriques devenant ainsi salifiables.

Nous remercions vivement la direction des *Laiteries Réunies* à Genève, qui a bien voulu mettre à notre disposition du lait frais centrifugé à son arrivée.

Nos remerciements s'adressent également à la Maison *A. Spöhr* à Lugano, à laquelle nous sommes redevables d'une quantité importante de peptolab.

Les électrophorèses ont été faites avec l'aide précieuse de M. *P. Bernfeld*, privatdocent à l'Université, à qui nous renouvelons également l'expression de notre reconnaissance.

¹⁾ Helv. **33**, 398 (1950).

